



21 Aktenzeichen: 197 09 512.7  
22 Anmeldetag: 8. 3. 97  
43 Offenlegungstag: 10. 9. 98

71 Anmelder:  
Hobom, Gerd, Prof. Dr.Dr., 35392 Gießen, DE

72 Erfinder:  
Hobom, Gerd, Prof. Dr.Dr., 35392 Gießen, DE;  
Neumeier, Elisabeth, Dr., 35392 Gießen, DE; Flick,  
Ramon, Dipl.-Biol., 35392 Gießen, DE; Zhou, Yan,  
35392 Gießen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren für die Herstellung von attenuierten lebenden, rekombinanten Influenza A-Viren mit inkorporierten fremden Glykoproteinen zur Verwendung als nasal/orale Vakzinen und als genetische Vektorsysteme

57 Beschrieben wird ein Verfahren für die Inkorporation von Glykoproteinen (Typ I) beliebiger Herkunft oder von anderen Proteinen, die mit einem C-terminalen Membrananker ausgestattet wurden, in die Virionhülle (envelope) von Influenza A-Viren, verbunden mit der Verankerung der zugehörigen Fusions-Gene in das Genom dieser Viren. Deren Hochexpression in den infizierten Zellen wird durch die Verknüpfung mit aktivitätsverstärkenden Promotor-Varianten gewährleistet.

Für die Herstellung der rekombinanten Viren wird ein indirekt wirkendes Selektionsverfahren (in zwei Variationen) eingesetzt, das durch ein in Doppel-Konstrukten vorgesehtes grünfluoreszierendes Protein (GFP)-Gen als Lebend-Markierung die rekombinant infizierten Zellen leuchten und per FACS-Zellsortierung von den übrigen Zellen abtrennen läßt. Mit dem gezielt herbeigeführten Verlust des vorgesetzten GFP-Gens in einem Teil der Tochtervirus-RNAs tritt unter den sekundär infizierten Zellen ein Anteil ohne GFP-Fluoreszenz auf, der nach erneuter FACS-Zellsortierung die gewünschte Population von rekombinanten Viren für die weitere Vermehrung darstellt.

Die beschriebenen rekombinanten Viren finden Verwendung als (Doppel-)Vakzine oder als Vektoren in der Genetik und Gentherapie.

## Beschreibung

## Technisches Gebiet der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Influenza A-Viren, die sowohl in ihrem Genom die entsprechenden (Fusions-)Gene, als auch in der Hülle ihrer Virionen vollständige Membran-verankerte fremde Glykoproteine oder auch Membran-verankerte beliebige Proteine zusätzlich zu ihren normalen Genen und Oberflächenproteinen enthalten. Die fremden Typ I-Glykoproteine können viralen, animalen oder humanen Ursprungs sein und werden unter Verwendung ihres eigenen Membransegments oder desjenigen vom Influenza-Hämagglutinin in die Virionhülle inkorporiert. Die gleiche Transmembrandomäne kann auch an den C-Terminus von anderen Proteinen angekoppelt werden, die sich damit z. T. als artefizielle Membranproteine in der Virushülle verankern lassen. Technische Elemente dieser dem Bereich der Gentechnik zugehörigen Erfindung sind ferner ein indirekt wirkendes Selektionsverfahren (in zwei Ausführungen), mit dem rekombinante Viren stark angereichert werden können, welche ein beliebiges Fremdgen tragen (unabhängig von dessen Eigenschaften), sowie die Verwendung von Promotor-verstärkten Mutanten und die Erzeugung von (rekombinanten) Influenza vRNA-Molekülen in vivo durch die zelluläre RNA-Polymerase I (beides Gegenstand der Patent-Anmeldung PCT 95/03663, G. Hobom et al. und Fa. Bayer AG).

Präparationen rekombinanter Influenzaviren der beschriebenen Zusammensetzung (auch im Gemisch mehrerer Konstrukte) erfüllen die Kriterien von Lebendvakzinen für Influenza bei Mensch oder Tier, bzw. von Doppelvakzinen z. B. für Influenza-Viren und für Schweinepest-Viren bei gleichzeitiger Immunisierung beim Schwein usw. Andere Virus-Konstrukte mit fremden, besonders zellulären Glykoproteinen und ggf. einem weiteren zytotoxisch wirkenden Gen sind geeignet als Vektorsysteme in der Genetik und der somatischen Gentherapie.

## Stand der Technik

1. Eine Reihe gut untersuchter Viren konnten bereits durch gezielte Eingriffe in Virus-Vektorsysteme für den Transfer von Fremdgenen verwandelt werden. Durch Deletion einiger jedenfalls unter Laborbedingungen entbehlicher Gene hat man Platz für die Aufnahme der Fremdgene geschaffen, die während der Infektion (meist unter der Kontrolle von virusentlehnten Signalsequenzen) zusammen mit den Virus-eigenen Genen exprimiert werden. Neben den Verfahren zur rekombinanten Proteingewinnung wie z. B. durch Baculovirus-Vektoren (in Insekten bzw. Insektenzellen) dienen verschiedene Vektorsysteme abgeleitet von den Vaccinia, Herpes, Adeno- oder den Adeno-assoziierten Viren zum heterologen Gentransfer in die Zellen eines infizierten Organismus, bzw. in den letzteren Fällen auch zur in vivo Gentherapie. Das Fremd-Gen ist in allen diesen Fällen jedoch im Virion nur als Gensequenz vorhanden und trifft erst nach der Infektion in den infizierten Zellen als Protein in Erscheinung. Neben den genannten DNA-Viren ist dieses Prinzip auch auf Retroviren (besonders abgeleitet vom murinen Moloney Leukämievirus MoLV) und auf RNA-Viren wie das Rabies-Virus (Schnell et al., 1994) oder das Masern Virus (Sidhu et al., 1995) oder übertragen worden. Während auch hier in aller Regel das heterologe Genprodukt nur in der infizierten Zelle in Erscheinung tritt, ist in einigen Fällen das Virus-eigene Glykoprotein durch das eines anderen Virus ersetzt worden, besonders im Falle von MoLV-Vektorsystemen deren env-Protein durch das Glykoprotein des Vesic-

ulär-Stomatitis-Virus (VSV; Burns et al., 1993), was dann für das rekombinante Virus zu einem VSV-spezifischen Infektionsprozeß führt.

Dieses Prinzip der Vektor-Abwandlung von Virus-Grundstrukturen ist in der vorliegenden Erfindung übertragen worden auf Influenza A-Viren, und hier besonders auf die Expression von fremden Glykoproteinen, die nicht nur als Fremdgene in das Genom, sondern auch als heterologe Proteine zusätzlich zu den eigenen Proteinen Hämagglutinin und Neuraminidase in die Hülle (envelope) dieser Viren integriert werden können. Anders als bei den meisten Viren handelt es sich dabei um eine zusätzliche Aufnahme dieser fremden Gene und Proteine in den Virusverband, d. h. verbunden mit einer Ausweitung des Genoms und einer Veränderung ihrer Oberflächenstruktur. Damit sind rekombinante Viren dieses Aufbaus grundsätzlich als Doppel-(oder Mehrfach-)Vakzine geeignet – auch für eine nasale/orale Applikation – vorausgesetzt, sie lassen sich zuverlässig attenuieren (s. u.). Ein besonderer Vorteil liegt bei der Verwendung rekombinanter Influenzaviren darin, daß die hinzugefügten Fremdgene mit einer besonders starken Promotorvariante (1104; Neumann und Hobom, 1995) verknüpft werden können, die zu hohen Expressionsraten der Fremdproteine führt.

2. Die Vakzinierung gegen Influenza A-Viren ist bisher auf inaktivierte bzw. durch Detergentien desintegrierte Viren (d. h. auf Proteingemische) abgestellt. Nach einer Injektion stimulieren diese Präparate eine B-Zell-Antwort mit Antikörperproduktion, jedoch (so gut wie) keine Reaktion der CD8-T Zellen, wie das bei einer normalen Infektion bzw. bei einer Lebend-Vakzinierung zusätzlich der Fall wäre. Auch ist bei der hierfür unphysiologischen Injektionsmethode zwar die Synthese von spezifischen IgG-Antikörpern im Serum, nicht jedoch die von sekretierten IgA-Molekülen im respiratorischen Trakt merklich erhöht, die auf der Oberfläche der Mucosa die erste Schutzfunktion ausüben. Und schließlich können die gegen ein "fixiertes" Hämagglutinin (auch wenn als Gemisch eingesetzt) gebildeten Antikörper die spätere Abwandlung der Virusstrukturen in ihrem "genetischen Drift" nicht vorwegnehmen, sie werden dadurch auch ihre Schutzwirkung im Serum gegen die stärkere Ausbreitung der Influenza-Infektion im Körper später wieder verlieren.

Die gegenwärtig eingeführte Influenza-Vakzine ist damit anderen Virusvakzinen prinzipiell unterlegen, bei denen ein attenuiertes, lebendes Virus verwendet wird (z. B. bei der Polio-Vakzine), und bei denen durch eine (limitierte) virale Replikation und Proteinsynthese in den infizierten Zellen neben einer B-Zellen-Stimulation in MHC I-vermittelter Kontakt auch die spezifischen T-Zellen-Reaktionen (CD4 und CD8) initiiert werden. Auch erfolgt die übliche Influenza-Immunisierung in einer unphysiologischen Weise, nämlich durch Injektionen, womit gegenüber der natürlichen Infektion in den Rachenschleimhaut-Zellen Gruppen von Lymphozyten in abweichender Lokalisation im Körper erreicht werden, was – nicht völlig verstanden – zu einer andersartigen B-Zellen-Antwort (z. B. im Verhältnis IgG zu IgA, s. o.) führt. Auch in anderen Fällen hat sich ein Immunisierungs-Modus möglichst nahe an der natürlichen Infektion bewährt, was im Falle der Influenza-Viren wie bei anderen Aerosol-Atemwegs-Infektionen auf eine nasal/orale Lebend-Vakzinierung verweist. Dieser Weg soll mit der vorliegenden Erfindung beschritten werden, und zwar auch als Doppel-Immunisierungs-Strategie, wenn z. B. beim Schwein zugleich gegen das Schweine-Influenzavirus und gegen das Schweine-Pestvirus, die beide auf aerogenem Wege übertragen werden, immunisiert wird. Hierzu werden erstmals fremd-virale Glykoproteine wie das Schweinepestvirus-Protein E2 in das Influenza-Virion vollständig und in

(weitgehend) authentischer Konformation integriert, was für die Ausbildung der an den Oberflächen dieser Glykoproteine gelegenen (nicht-linearen) antigenen B-Zell-Epitope von Bedeutung ist. Zugleich sorgt die genetische Verankerung im Influenza-Genom dafür, daß diese Proteine in den abortiv infizierten Zellen nachgebildet werden und auf deren Oberfläche in gleicher Konformation erscheinen, was die B-Zellen-Reaktion weiter stimuliert, ergänzt ferner durch eine Stimulation der CD4-Helferzellen auf der Basis MHC I-präsentierter T-Zell-Epitope. – Bisher konnten genetisch-verankert nur kurzketzige Segmente fremder Proteine auf der Oberfläche von Influenza-Virionen präsentiert werden, und zwar integriert in Influenza-eigene Glykoproteine, besonders in den Stiel der Neuraminidase (Percy et al., 1995). Möglich war außerdem die für Immunisierungen jedoch ungeeignete Form der transienten Integration fremd-viraler Glykoproteine nach Virus-Doppelinfectionen bei dem sogenannten "phenotypic mixing".

3. In der Vergangenheit sind attenuierte Varianten von Viren oft durch serielle Passagen unter marginalen Wachstumsbedingungen oder in unnatürlichen Wirtszellen, d. h. durch zufallsbedingte Mutations-, und unter unklaren Selektionsbedingungen erzeugt worden. Erst mit der reversen Genetik und jetzt durch gezielte gesetzte Mutationen können attenuierte Virus-Varianten in kontrollierter Weise aufgebaut werden, die dann jedoch wie früher auch auf die Auswirkung dieser Mutationen untersucht werden müssen, und zwar zunächst in der Zellkultur und im Tierversuch. Als attenuierte Influenza-Varianten für Impfstoffe sind bisher vor allem verschiedene (mehrfach) temperatursensitive Mutanten vorgeschlagen worden, deren Nukleotidsubstitutionen jedoch prinzipiell bei jeder Vermehrung einer Reversion unterliegen können. In dieser Erfindung werden statt dessen zwei davon verschiedene Prinzipien eingesetzt. Als erstes wird ein überstarker viraler Promotor in Verbindung mit dem Fremdgen in nur einem der dann insgesamt neun verschiedenen Influenza-vRNA-Moleküle verwendet, zur Überexpression und Überreplikation dieser einen vRNA im Vergleich zu den acht übrigen, die dem Helfervirus entstammen und allesamt für die Virusvermehrung erforderlich sind. Bei statistischer Verpackung aller neun vRNA-Moleküle entsprechend ihrer individuellen Konzentration und bei einer begrenzten Aufnahmekapazität der Virionen von ca. 15 solcher Moleküle werden dann durch die vermehrte Anzahl der Kopien von Fremd-RNA einzelne der acht Influenza-vRNAs aus den sich bildenden Virionen verdrängt, was bei diesem zum Verlust der Vermehrungsfähigkeit und insgesamt zum Abfall der Plaquebildungsrate für die sich bildenden Partikel führt, und zwar typischerweise in einer Passage um drei bis vier Zehnerpotenzen. Als zweites Attenuationsprinzip werden Ribozyme verwendet, die in sequenzspezifischer Reaktion gegen einzelne der Helfer-vRNA-Segmente gerichtet sind. Dadurch wird die jeweilige Gen-Sequenz in hoher Ausbeute zerstört und kann auch nicht beim Verpackungsvorgang in die sich bildenden Impfviren aufgenommen werden. Der Ausfall des zugehörigen Genproduktes wird hierbei durch DNA-Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten bzw. durch Vermehrung in Zelllinien mit chromosomaler Expression des fehlenden Proteins ausgeglichen.

Damit beschreibt und enthüllt diese Erfindung die Konstruktion von rekombinanten Influenzaviren mit Hochexpression fremder Genprodukte einschließlich fremder Glykoproteine, die durch statistische Verdrängung wie vor allem durch kontrollierte Zerstörung einzelner Gene in ihrer Virulenz attenuiert sind, und daher als Vakzine eingesetzt werden können.

## Konstruktionselemente der Erfindung

### 1. RNA-Polymerase I-Methode für die Expression von (rekombinanten) Influenza vRNA-Molekülen

Der Aufbau rekombinanter Influenzaviren auf der Basis entsprechender Plasmidkonstrukte in E.coli K12 verwendet die in diesem Labor entwickelte Methode der intrazellulären Erzeugung von rekombinanten vRNA-Molekülen durch das Enzym RNA-Polymerase I nach Plasmid-DNA-Transfektion der entsprechenden cDNA-Konstrukte (Zobel et al., 1994; Neumann et al., 1994), niedergelegt in Patentanmeldung PCT 95/03663 (Hobom et al. sowie Bayer AG). In Erweiterung zu der dort genannten Methode wird entweder der murine RNA-Polymerase I-Promotor (in Maus-Zelllinien) oder der humane RNA-Polymerase I-Promotor (in humanen oder in Affen-Zelllinien, besonders in COS-7) verwendet, während die Terminator-Sequenz austauschbar in allen Zelllinien aus der einen oder anderen rDNA stammend aktiv ist.

### 2. RNA-Polymerase II-Methode zur Expression von (rekombinanten) Influenza vRNA-Molekülen

Alternativ zur vorgenannten Standard-Methode können RNA-Moleküle mit Influenza-vRNA-typischen Endsequenzen in zwei Schritten statt einem auch durch das normale zelluläre Transkriptionsverfahren mit RNA-Polymerase II, hier jedoch in Minus-Strang-Orientierung erzeugt werden. Dafür wird das 3'-Ende der vRNA aus dem Primärtranskript heraus durch ein spezifisch konstruiertes cis-Ribozym gebildet (das primär gebildete 3'-Ende der mRNA einschließlich der Hepatitis  $\delta$ -Ribozymsequenz selbst wird damit nukleolytisch entfernt; Menke und Hobom, 1997). Das über die virale 5'-vRNA-Promotorsequenz hinausreichende 5'-Ende des Primärtranskriptes (z. B. 12 Nukleotide mit 5'-Cap-Struktur) geht anschließend im Zuge der vRNA-Amplifikationsreaktion verloren, die auch bei einer solcherart verlängerten Matrize an der normalen 5'-Position die Synthese der Influenza mRNA sowie cRNA startet. In zwei Schritten entsteht damit ein vermehrungs- und verpackungsfähiges vRNA-Molekül auch aus einem mRNA-Vorläufer heraus, wie er beispielsweise unter der Kontrolle eines pCMV-Promotors gebildet wird.

### 3. Mutationen der viralen Promotorsequenz, an den 5' und 3'-Enden der vRNA

Verstärkende Mutationen der viralen Promotorsequenz in verschiedener Abstufung, besonders aber die deutlich wirksamen Mutationen 1104 und 1102 (Neumann und Hobom 1995; in der bereits genannten Patentschrift) werden durchweg als Endsequenzen in den rekombinanten vRNA-Molekülen, d. h. in Verbindung mit den Fremdgenen verwendet. Sie orientieren sich an der "Korkenzieher"-Sekundärstrukturinterpretation für die aktivierte Form dieser Promotorsequenzen (Flick et al., 1996).

### 4. Expression fremder Glykoprotein-Gene und Inkorporation der Glykoproteine in die Virionen

Die Gene verschiedener fremder Glykoproteine vom allgemeinen Typ I, d. h. mit einer C-Terminus-nahen hydrophoben Membrananker-Sequenz werden wie zur Expression anderer Gene auch zum Aufbau entsprechender cDNA-Konstrukte verwendet, so daß entsprechende artefizielle vRNA-Moleküle gebildet werden können, und zwar in Minusstrang-Orientierung bzw. Gegenstrang-Richtung. Die Fremdgene nehmen dabei den Platz der kodierenden Se-

quenz von Influenza-Genen ein, flankiert von authentischen oder leicht abgewandelten nichtkodierenden Bereichen, wie sie in den Influenza vRNA-Molekülen vorliegen. Neben einem eigenen oder aber vom Hämagglutinin (HA) entlehnten Signalpeptid umfaßt die Glykoprotein-Sequenz dann die vollständige eigene, also HA-fremde Ekto-Domäne und anschließend entweder die eigene oder häufiger die Hämagglutinin-Transmembran-Domäne einschließlich einer C-terminalen "cytoplasmatischen" Endsequenz (bei HA: 26 + 11 Aminosäuren). Das gleiche Konstruktionsprinzip gilt auch für Nicht-Glykoproteine, die erst durch die Verbindung mit den beiden flankierenden Signal- und Membransegmenten des Hämagglutinins zu artefiziellen Oberflächenproteinen auf dem Virion umgestaltet werden, z. B. für das grün-fluoreszierende Protein aus *Aequoria victoria* (GFP). Mit den Hämagglutinin-Sequenzen in der Membran verankert handelt es sich im Ergebnis zwar um Fusionsproteine, deren gesamte unveränderte Ektodomäne gleichwohl davon unbeeinflusst in der Normalkonformation ausbilden kann, erkennbar im genannten Fall an der GFP-Fluoreszenz.

#### 5. Indirekte Selektionsmethode für rekombinante Influenza-Viren

Die durch RNA-Polymerase I (oder RNA-Polymerase II) in den cDNA-transfizierten Zellen gebildeten rekombinanten vRNA-Moleküle benötigen für ihre Konversion in pseudo-virale mRNAs und für die anschließende Amplifikation über cRNAs wieder zu vRNAs die virale RNA-Polymerase der Helferviren, zur schließlich folgenden Verpackung zusammen mit dem Helfervirus-vRNAs dann auch alle übrigen Genprodukte einschließlich der Strukturproteine. Die gleichzeitig gebildeten unveränderten Helferviren dominieren der Zahl nach im Gemisch der Tochterviren.

Die Selektion der rekombinant transfizierten bzw. rekombinant infizierten Zellen (nach "Viruspassage" des primär gebildeten Zell-Überstandes mit den Tochterviren darin auf frische Zellen) gegenüber den nicht infizierten bzw. den nicht rekombinant-infizierten Zellen gelingt mit Hilfe der Expression von GFP und dessen Fluoreszenz-Emission von 590 nm bei Anregung durch 483 nm (Chalfie et al., 1994; Cubitt et al. 1995; Siemering et al., 1996). Das GFP-Gen ist für diesen Zweck eingebracht worden in bicistronische vRNA-Segmente, und zwar als erstes Cistron am 5'-Ende dieser mRNAs, während das eigentlich interessierende beliebige Fremdgen den distalen Platz auf den viralen mRNAs einnimmt. Auf dem vRNA-Gegenstrang liegt mithin die Reihenfolge invertiert vor. Vor und hinter der inversen GFP-Sequenz sind hier Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptor Signale mit partieller Wirksamkeit angeordnet, die in den infizierten Zellen (während der "Viruspassage") bei einem Teil der vRNA-Moleküle das GFP-Gen durch eine Spleiß-Reaktion entfernen. Die in der nächsten Passage infizierten Zellen haben dann die GFP-Fluoreszenz verloren und exprimieren jetzt statt dessen das vorher distale Genprodukt der bicistronischen RNA-Segmente. In der zweiten (oder dritten) FACS-Sortierung werden jetzt daraufhin die nicht-fluoreszierenden "dunklen" Zellen aussortiert und deren Virus-Überstand dann für die weitere Vermehrung verwendet. – Das Verfahren beschreibt erstmalig eine Spleißreaktion auf der Ebene einer genomischen vRNA, und damit zugleich an einer Minusstrang-RNA.

Eine zweite indirekte Selektionsmethode für Fremdgene beruht ebenfalls auf der Fluoreszenz eines vorgeschalteten GFP-Gens, das hier jedoch durch ein alternativ wirkendes Replikationssignal abgegliedert ist von dem nachfolgenden, indirekt zu selektierenden Gen. Bicistronische vRNA-Segmente dieser Art tragen zusätzlich zu deren Lokalisation am

3'-Ende eine weitere 3'-Promotorsequenz in der Mitte zwischen den beiden Cistrons, so daß die Gesamt-Promotorstruktur gebildet aus den 5'- und 3'-Anteilen sich hier alternativ einerseits über beide Cistrons hinweg ausbilden kann, oder aber andererseits nur über das Fremdgen hinweg, was zum replikativen Verlust des nicht einbezogenen GFP-Gens führt. Die zweistufige Selektion durch FACS-Sortierung führt hier in gleicher Weise wie oben zur Isolierung bzw. Anreicherung von Influenzaviren mit beliebigen fremden Genen.

#### 6. Gezielte Mutagenese der Influenza-Gene – Selektion durch Ribozym-Spaltung

Die Inkorporation fremder Gene in rekombinante Influenzaviren ist wegen des damit verbundenen neuen Phänotyps leichter zu detektieren und zu isolieren als es die gezielt konstruierten Varianten virus-eigener Gene sind, – verborgen in einer Überzahl von unveränderten Helferviren. Für deren Selektion muß ein Umweg beschritten werden, der in der Konstruktion einer Serie von spezifisch veränderten Helferviren besteht, die alle eine Ribozym-Schnittstelle in jeweils einem ihrer vRNA-Segmente tragen, und zwar in dem Bereich der nichtkodierenden 5'- oder/und 3'-Flankensequenzen. Sie wurden zu diesem Zweck selbst gezielt verändert und über mehrfache Plaque-Reinigung isoliert. Im Gemisch mit "seinem" spezifischen Helfervirus läßt sich das analoge, im kodierenden Bereich gezielt veränderte, jedoch in den Außenflanken die unberührte Wildtypesequenz aufweisende vRNA-Segment aus der RNA-Polymerase I-Transkription durch Ribozym-Einwirkung herausisolieren. Zu dem Zweck werden die entsprechenden Wirtszellen zuvor mit einem cDNA-Konstrukt transient transfiziert, welches ein spezifisch wirkendes Ribozym (vom hammerhead-Typ) exprimiert, gerichtet gegen die Schnittstelle in der einen vRNA-Flankensequenz im ausgewählten Helfervirus. Die so vorbehandelten Zellen werden anschließend mit dem Virus-Gemisch infiziert (in einer "Passage"), wobei der Großteil eines der acht Helfervirus-Segmente durch Spaltung zerstört wird, während das mutierte Ersatz-Segment überdauert und sogar amplifiziert wird. Diese Behandlung kann in einem zweiten Durchlauf wiederholt werden und liefert die gezielt veränderten Virus-Mutanten in einheitlicher Population. Für eine höhere Reaktionsausbeute und auch zur Absicherung gegen eine mögliche Mutation im Zuge des genetischen Drifts in der Ribozym-Erkennungsstelle auf der vRNA sind diese ebenso wie die zugehörigen Ribozyme in der Form von Tandem-Dimeren ausgebildet (Menke und Hobom, 1997).

#### 7. Virus-Attenuation durch vRNA-Ribozym-Spaltung und kompensierende Protein-Komplementation

Die schon beschriebene Ribozymsspaltung der vRNA eines Helfervirus-Segments führt bei fehlender Kompensation durch ein neugebildetes Segment gleicher Funktion zu einer nur abortiven Infektion, es werden keine oder höchstens sehr wenige Tochterviren gebildet. Die Komplementation der fehlenden Genfunktion kann jedoch statt durch eine vRNA auch durch das zugehörige Protein erfolgen, d. h. durch die Proteinexpression auf der Basis einer RNA-Polymerase II-Expression, die jedoch dabei keine verpackungsfähigen RNA-Moleküle entstehen läßt. In den zuvor transient doppelt DNA-transfizierten Zellen – (Ribozym-Konstrukt; Expressionskonstrukt für ein virales Protein) werden als Ergebnis einer anschließenden Virus-Infektion zwar Tochterviren gebildet, die jedoch bei fehlendem Gensegment nur noch einstufig (abortiv) infektiösfähig, nicht aber

in den neu infizierten Zellen vermehrungsfähig sind. Damit eignen sich die so attenuiert gebildeten Viren als Impfviren; zusätzlich zu der teilweisen Expression der eigenen Gene in den abortiv infizierten Zellen ist bei ihnen die Expression fremder Proteine und Glykoproteine zum Zwecke der Steigerung bzw. der Ausweitung der Immunantwort möglich.

#### 8. Helferviren und Gewebekulturzellen

Als Standard-Helferviren werden verschiedene Hühner-Influenzaviren (KP- bzw. FPV-Viren) verwendet (H7-HA): FPV-Bratislava, FPV-Rostock oder FPV-Giessen. Außerdem wurden dafür mehrere Virus-Reassortanten eingesetzt, gebildet in Doppel-Infektionen aus einem H7- und einem H2-Virus (Scholtissek et al., 1979), sowie schließlich für Einzelversuche die unter (6) genannten speziellen Helfervirus-Stämme. Die späteren Viruspassagen wurden routinemäßig auf den Standard-Zelllinien MDCK und MDBK durchgeführt, während der erste Schritt zur Synthese rekombinanter Viren über die RNA-Polymerase I-Expression von cDNA-Konstrukten entweder auf Mäusezelllinien angewiesen ist (u. a. B 82; Konstrukte enthalten den rDNA-Promotor der Maus) oder auf humane bzw. Affenzelllinien (z. B. COS-7; Konstrukte enthalten den humanen rDNA-Promotor).

#### Beispiel 1

##### Inkorporation von CSFV-Glykoprotein E2 in influenza-Virionen

Das Schweinepestvirus (CSFV = contagious swine fever virus) ist auch gegenwärtig eine bedeutende Bedrohung der Schweinezucht in Deutschland und Europa. Bei stärkerem Verkehr und Handelsaustausch mit den osteuropäischen Ländern könnte die Infektionsgefahr weiter zunehmen und der Bedarf an einer wirksamen Vakzine z. B. zur Eindämmung einer Epidemie weiter zunehmen, – auch in den östlichen Ländern selbst. CSFV besitzt als Pestivirus ein RNA-Plusstrang-Genom mit einem langen Leseraster, der in ein alsbald proteolytisch zerlegtes Polyprotein übertragen wird. Von den Spaltprodukten werden drei als Envelope-Proteine auf der Oberfläche der Virionen gefunden: Glykoproteine Eo (=Ems), E1 und E2, von denen das E2-Protein die Rezeptor-Bindungsstelle enthält (Rümenapf et al., 1993). Die Morphogenese der CSFV-Virionen findet im Bereich des Trans-Golgi-Netzwerks statt, also nicht an der Plasmamembran der Zelloberfläche, die auch von keinem der einzelnen Glykoproteine erreicht wird. Die intrazellulären Transportabläufe sind damit völlig verschieden von denen des Influenzavirus und seiner Glykoproteine.

Das cDNA-Segment mit der kodierenden Sequenz für die CSFV-Glykoprotein E2-Ektodomäne samt einer vorangehenden Region entsprechend einem 23 Aminosäuren langen Signalpeptid (Signalase-sensitiv), insgesamt 364 Codons überdeckend, von Nukleotidposition (Meyer et al., 1989): 2362 (ATA = Isoleucin, hier jedoch verwandelt in ATG = Methionin) bis 3454 (TTT = Phenylalanin, hier jedoch verwandelt in TGG = Tryptophan) ist im Austausch inkloniert worden in ein vRNA-Expressionskonstrukt für das Hämagglutinin. Dabei sind von der Sequenz des Influenza-Segments 4 erhalten die flankierenden 5'- und 3'-Enden, vor dem Startcodon des Fusionsproteins jedoch entsprechend der Kozak-Sequenz (Kozak, 1991) verändert, sowie der gesamte Abschnitt entsprechend der HA-Transmembran-Domäne und dem C-Terminus (Nukleotide 1-29 und 1623 bis 1768 in der cRNA-Numerierung). Die im Konstrukt pHL1959 (Abb. 1) verwendete Promotor-Mutante 1104 ent-

hält dabei noch Nukleotidaustausche an den Positionen 3, 5 und 8 (Neumann und Hobom, 1995). Die Fusionsgrenze des Proteins zwischen der E2-Ektodomäne und der HA-Transmembrandomäne wird auf der cDNA-Ebene durch eine BamHI-Schnittstelle markiert. Der beschriebene zentrale cDNA-Abschnitt des Konstrukts ist zur Expression als vRNA-Minusstrang in pHL1959 nukleotidgenau umrahmt von dem murinen rDNA-Promotor und -Terminator, d. h. von den Segmenten -254 bis -1 (bezogen auf den Transkriptionsstart der Vorläufer-rRNA) und +571 bis +745 (bezogen auf das 3'-Ende der reifen 28S rRNA). Die Replikation in E.coli K12 und die Ampicillin-Selektion werden getragen von dem umschließenden Basisvektor pBluescript SK (vgl. Abb. 1).

Nach Lipofectamin-vermittelter DNA-Transfektion von pHL1959 DNA in murine B82 Zellen, gefolgt nach 24 Stunden (2–30 Stunden) von der FPV-Bratislava Helfervirus-Infektion (moi:2–5) werden in den Nukleoli der transfizierten und infizierten Zellen durch die zelluläre RNA-Polymerase I pseudo-vRNA-Moleküle erzeugt, und anschließend im Kern durch die virale RNA-Polymerase in virale mRNA-Moleküle überführt (nach dem "Cap-Snatching"-Prinzip; Krug et al., 1989). In der späteren Phase der Virus-Infektion werden dann auch cPNA-Moleküle, und in erneuter Umschreibung schließlich Tochter-vRNA-Moleküle gebildet. Die viralen mRNA-Moleküle führen zur Synthese des E2-HA-Fusionsproteins, das an der Oberfläche der Zellen erscheint und dort in indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden kann (Abb. 2). Dort wird es weiter in die sich bildenden Influenza-Virionen inkorporiert (Abb. 3 und 4), als drittes Glykoprotein in der Virion-Hülle ("envelope"), neben den Glykoproteinen HA und NA des Helfer-Influenzavirus. Der Transport zur Zelloberfläche und die Inkorporation in die (fremden) Virionen ist abhängig von der HA-Transmembrandomäne (Abb. 5), und Kontrollklone mit dem E2-Transmembransegment werden auch unter den Bedingungen einer Influenza-Infektion nicht an die Oberfläche transportiert oder in die Influenza-Virionen inkorporiert (Spur 6 in Abb. 3). Die C-terminale Sequenz von 11 Aminosäuren kann dabei abgewandelt werden, ohne daß das Transportverhalten in der Zelle und der Einbau des Fusionsproteins in die Virionen davon entscheidend berührt wurden. (Spuren 3 bis 5 in Abb. 3). Der Transport des Fusionsproteins an die Zelloberfläche ist unabhängig von anderen viralen Proteinen und erfolgt auch bei einer Expression durch RNA-Polymerase II in Abwesenheit der Influenza-Infektion (nicht gezeigt).

Neben der Inkorporation des Fusionsproteins in die Virionen wird auch die zugehörige vRNA in die Viren verpackt und kann nach (mehrfacher) Viruspassage auf der Oberfläche der neuinfizierten Zellen ebenso wie in den dort gebildeten Virionen nachgewiesen werden, wegen der Verbindung mit einem verstärkten Promotor in ansteigender Konzentration (bis zu 1 : 1 relativ zum HA). Die Infektiosität der Viren ist davon nicht beeinträchtigt, was die voneinander unabhängige Inkorporation und Oligomerisierung der verschiedenen Glykoproteine in den Virionen belegt, da die Homo-Trimerisierung von HA ebenso wie die Homo-Tetramerisierung von NA Voraussetzung für ihre Funktion im Zuge der Infektion ist.

#### Beispiel 2

Expression von grün-fluoreszierendem Protein durch rekombinante Influenzaviren und FACS-Zellsortierung der GFP-Influenza-infizierten Zellen

Die cDNA für die Sequenz des grün-fluoreszierenden

Proteins (GFP) aus *Aequoria victoria* ist in pHL1972 (Abb. 6) bzw. in weiteren solchen Konstrukten einschließlich pHL2251 in aktivitätssteigernd mutierter Form (Chalfie et al. 1994, Cubitt et al. 1995, Siemering et al., 1996) in RNA-Polymerase I-Expressionsvektoren integriert worden. Dabei ersetzen die 246 Codons der GFP-Sequenz plus sechs Codons einer Histidinfolge am C-Terminus die kodierende Sequenz des NP-Gens im Segment 5, erhalten sind dann nur die flankierenden nicht-translatierten Sequenzen am 5'- und 3'-Ende dieses Segmentes, abgeändert allerdings gemäß der 1104-Promotorvariante (Neumann und Hobom, 1995) und für eine Optimierung des Translationsstarts nach Kozak (1991). Umrahmt wird der zentrale Teil des Konstruktes in diesem Falle durch den RNA-Polymerase I-Promotor aus der humanen rDNA (-407 bis -1, bezogen auf den Startpunkt der Vorläufer-rRNA) und den RNA-Polymerase I-Terminator aus der murinen rDNA (in den gleichen Grenzen wie im Beispiel 1), während die E.coli K12-Kassette gleichfalls dem Konstrukt pHL1959 in Beispiel 1 entspricht.

Die Zellspezifität des humanen Promotors bedingt, daß hier die Lipofectamin-DNA-Transfektion in COS-7-Zellen ausgeführt wird. Die Superinfektion mit FPV Bratislava als Helferviren (moi: 1-5) nach 20-24 Stunden führt bei pHL1972 nach drei bis vier Stunden, bei pHL2251 nach 2 bis 3 Stunden zur GFP-Fluoreszenz in den sowohl transfizierten wie infizierten Zellen, typischerweise in einem Anteil an der Zellpopulation von 15%-25% (Abb. 7), in der Ausbeute abhängig besonders von dem Erfolg der Lipofectamin-Behandlung. Die gemischte Zellpopulation läßt sich in einem Fluoreszenz-aktivierten Zell-Sortierer (FACS; Becton-Dickinson) in fluoreszierende und in nicht-fluoreszierende Zellen (nicht transfiziert, oder nur durch Helferviren infiziert) aufspalten, in ihrer Extinktion stark unterscheiden, s. Abb. 8. Die fluoreszierenden Zellen werden durch Zentrifugation rekonzentriert und in Gewebekultur-Medium aufgenommen. Die von ihnen in der weiteren Inkubation freigesetzten Viren sind stark angereichert für rekombinante Viren, wie sich bei deren weiterer Passage zeigt: die von ihnen infizierten Zellen sind in hoher Ausbeute rekombinant infiziert, d. h. sie zeigen die durch das GFP-Segment bewirkte Fluoreszenz. Die FACS-Selektion kann auch nach der ersten Passage, d. h. an den mit einem Gemisch von rekombinanten und Helferviren infizierten Zellen ausgeführt werden, und trennt dann die rekombinant infizierten Zellen von den übrigen Zellen ab, die entweder nur durch Helferviren oder gar nicht infiziert sind.

#### Literaturzitate

- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033-8037.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS* 20, 448-455.
- Flick R, Neumann G, Hoffmann E, Hobom G. 1996. Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA* 2 1046-1057.
- Kozak M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell. Biol.* 115, 887-903.
- Krug RM, Alonso-Caplan FV, Julkunen I, Katz MG. 1989. Expression and replication of the influenza Virus ge-

nome. In: *The Influenza viruses* (RM Krug, ed.) Plenum Press, NY, p. 89-152.

Menke A, Hobom G. 1997. Antiviral ribozymes - new jobs for ancient molecules. In *Molecular Biotechnology* (Walker JM, ed) in press.

Meyers G, Rümenapf T, Thier HJ. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171, 555-567.

Neumann G, Zobel A, Hobom G. 1994. RNA polymerase I-mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology* 202, 477-479.

Neumann G, Hobom G. 1995. Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo. *J. Gen. Virol.* 76, 1709-1717.

Percy N, Barclay WS, Garcia-Sastre A, Palese P. 1995. Expression of a foreign protein by influenza A virus. *J. Virol* 68, 4486-4492.

Rümenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ. 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* 67, 3288-3295.

Schnell M, Mebatsion T, Conzelmann KK. 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 13, 4195-4203.

Scholtissek C, Vallbracht A, Flehmig B, Rott R. 1979. Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A virus. II. Highly neurovirulent recombinants derived from nonneurovirulent or weakly neurovirulent parent virus strains. *Virology* 95, 492-500.

Sidhu MS, Chan J, Kaelin K, Spielhofer P, Radecke F, Schneider H, Masurekar M, Dowling PC, Billeter MA, Udem SA. 1995. Rescue of synthetic measles virus minireplicons: Measles genomic termini direct efficient expression and propagation of a reporter gene. *Virology* 208, 800-807.

Siemering KR, Golbick R, Sever R, Haseloff J. 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6 1653-1633.

Zobel A, Neumann G, Hobom G. 1993. RNA polymerase I catalysed transcription of insert viral cDNA. *Nucleic Acids Res.* 21, 3607-3614.

#### Patentansprüche

1. Ein Influenzavirus-Vektor-System, geeignet für die Replikation, Transkription und Translation (Expression) fremder Genprodukte, dadurch charakterisiert, daß es ein oder mehrere Segmente mit fremder oder veränderter Gensequenz enthält, zusätzlich zu den RNA-Segmenten des normalen Virus-Genoms oder in deren teilweiser Substitution.
2. Viren entsprechend Anspruch 1, in denen in gezielter Weise eine oder mehrere Mutationen in die nicht kodierenden oder/und die kodierenden Regionen eingeführt wurden, bei einem oder mehreren Segmenten, welche quantitative oder/und qualitative Veränderungen an den verschiedenen viralen Genprodukten hervorrufen, einschließlich der vollständigen Deletion eines der viralen Gensegmente.
3. Viren entsprechend den Ansprüchen 1 und 2, in denen mindestens ein zusätzliches, modifiziertes Segment den acht originalen Influenza-vRNA-Segmenten hinzugefügt wurde, kodierend für eines oder mehrere fremde (oder veränderte eigene) Gene oder Gensegmente.
4. Viren entsprechend den Ansprüchen 1 bis 3, in denen das oder ein inkorporiertes Fremdsegment für ein Glykoprotein fremd-viraler, animaler, humaner oder anderer Herkunft kodiert, mit oder ohne Raster-Fusionsverbindung zu kodierenden Influenza-Sequenzen,

und bei denen zugleich das Glykoprotein selbst in die Hülle der Virionen inkorporiert wird.

5. Viren entsprechend dem Anspruch 4, in denen die fremde, als vRNA und als Protein inkorporierte Glykoprotein-Sequenz entnommen ist dem Genom des Schweinepestvirus (CSFV), des Bovinen Diarrhoe-Virus (BVDV), des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), des Borna-Virus (BDV), des Marburg-Virus, des Ebola-Virus, des Hepatitis C-Virus, des Frühsommer-Meningo-Encephalitis-Virus (FSME bzw. TBE), des West-Nil-Virus oder des humanen Immundefizienz-Virus (HIV).

6. Viren entsprechend den Ansprüchen 1 bis 3, in denen eines oder mehrere der inkorporierten Fremdgene für ein Lymphokin humanen oder animalen Ursprungs kodieren, das von der Influenzavektor-infizierten Zelle sekretiert wird.

7. Viren entsprechend den Ansprüchen 1 bis 3, in denen eines der Fremdgene für die Expression eines Apoptose-induzierenden Gens oder eines Toxin-Gens kodiert, wirksam in der primär infizierten Zelle oder nach Sekretion in benachbarten Zellen.

8. Eine Methode für die indirekte Selektion von Influenzavirus-Varianten gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 durch die FACS-Separation infizierter Zellen, bei der beliebigen Fremdgenen das Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequoria victoria* oder ein artefizielles Derivat davon vorgesetzt wurde, flankiert von vRNA-Spleißdonor- und Akzeptor-Signalen oder von verdoppelten Influenza-Replikations-Signalsequenzen solcher Aktivität, daß das GFP-Gen während der Virusvermehrung bzw. -passage mit mittleren Raten verloren geht.

9. Verwendung eines Virus entsprechend den Ansprüchen 1 bis 7 für die Präparation von pharmazeutischen Wirkstoffen.

10. Die pharmazeutische Präparation einer Virus-Vakzine gegen Influenza, oder mit doppelter Wirkung zugleich gegen Influenza und gegen ein zweites Virus über dessen inkorporiertes Glykoprotein, oder die Verwendung als Vektor für die Somatische Gentherapie, von einem der Viren entsprechend den Ansprüchen 1 bis 7.

---

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

---

45

50

55

60

65

- Leerseite -

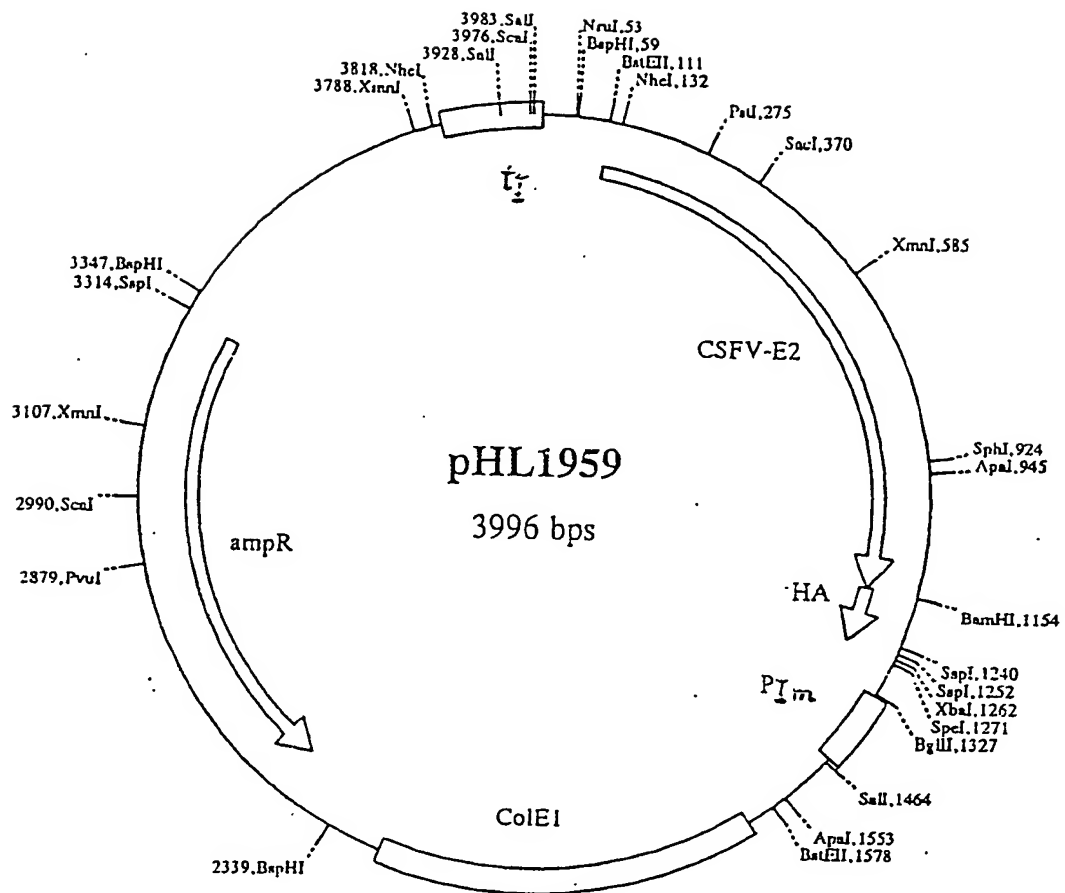


Abbildung 1: Genkarte des Plasmids pHL1959. Das cDNA-Fusionskonstrukt besteht aus der Ekto-Domäne des CSFV-E2 Glykoproteins samt eigenem Signalpeptid (leicht abgewandelt) und aus dem Transmembran-Segment samt C-terminaler Sequenz des Influenza-Hämagglutinins (HA). In Gegenstrang-Richtung angeordnet ist dieser Teil umrahmt von der murinen Promotorsequenz p<sub>m</sub> und der murinen Terminatorsequenz t<sub>i</sub>, beide aus der rDNA der Maus. ColE1: Plasmidreplikationssystem entlehnt aus dem *E.coli*-Plasmid colE1 (bzw. pBR328), ampR: Gen für Ampicillin-Resistenz. Große Pfeile zeigen die Leseraster und die Richtung ihrer Translation an, wichtige Restriktionsschnitte sind mit ihrer genauen Position eingetragen.



Abbildung 2: Transport des CSFV-E2-HA-Fusionsproteins zur Zelloberfläche.

MDCK-Zellen wurden infiziert in der Virus-Passage mit pHL1959-rekombinanten Influenza-Viren, d.h. mit dem Virus-haltigen Überstand von B82-Zellen nach deren Transfektion mit pHL1959 DNA und anschließender Infektion mit FPV-Bratislava als Helfervirus (Transfer 8 Stunden p.i.). Die MDCK-Zellen wurden 8 Stunden nach der Infektion fixiert und mit monoklonalem Antikörper A18, gerichtet gegen ein CSFV-E2-Epitop, und danach mit Anti-Maus-IgG, FITC-konjugiert behandelt, und schließlich unter dem Mikroskop auf ihre Fluoreszenz-Emission untersucht.

**Recombinant Influenza A/Bratislava  
expressing CSFV E2**

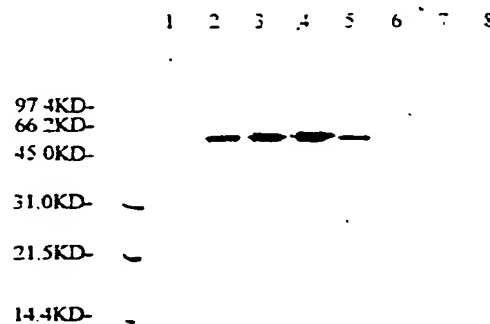


Abbildung 3: Western-Blott-Analyse von CSFV-E2-haltigen Influenzavirus-Präparationen. Die Überstände von MDCK-Zellen, infiziert in zweiter Virus-Passage mit pHL1959-rekombinanten Influenzaviren oder mit einer der unten näher bezeichneten Varianten davon, wurden 8 Stunden nach der Infektion gesammelt, und zweimal durch Hämagglutinin-spezifische Adsorption an Hühner-Erythrozyten gereinigt. Die gereinigten Viren wurden dann verwendet für die Protein-Trennung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, gefolgt von der Übertragung ('blotting') der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran. Für die Immunreaktion wurde als erster Antikörper der monoklonale Antikörper A18, und als Zweitantikörper eine Peroxydase-konjugierte IgG-Anti-Maus-Präparation benutzt. Spur 1: CSFV-Virus (Kontrolle); Spur 2: pHL1959; Spur 3: pHL1997 = Derivat von pHL1959: vorletzte Aminosäure C → S; Spur 4: pHL1998 = Derivat von pHL1959: fünftletzte Aminosäure C → S; Spur 5: pHL1999 = Derivat von pHL1959: Deletion der sechs terminalen Aminosäuren; Spuren 6 und 8: Zwei Derivate mit der Transmembran-Region von CSFV-E2, nicht der von Influenza-HA; Spur 7: Helfervirus-Infektion ohne vorangehende Transfektion.

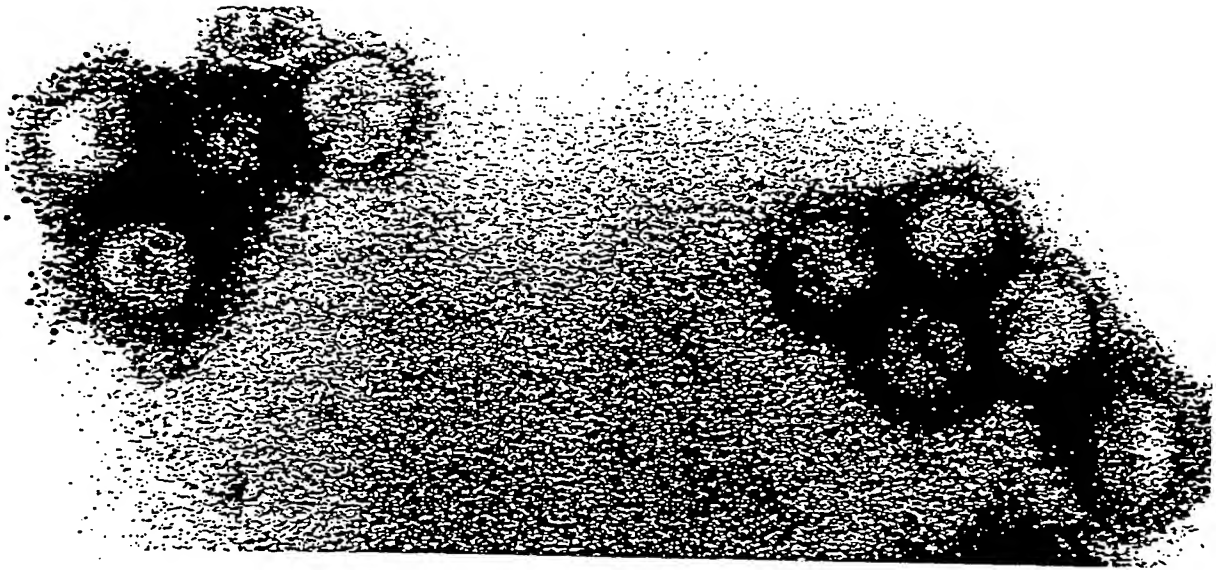


Abbildung 4: Elektronenmikroskopisches Bild eines Präparates pHL1959-rekombinanter Influenzaviren, markiert nach der Immunogold-Methode. Virushaltige Zellüberstände von MDCK-Zellen infiziert in zweiter Passage durch pHL1959-rekombinante Viren (im Gemisch mit FPV-Helferviren) wurden gesammelt, gereinigt durch zweifache Hämagglutinin-spezifische Adsorption an Hühner-Erythrozyten, sowie anschließend im Sucrose-Gradienten. Die Immunreaktion an den Viruspartikeln wurde mit dem monoklonalen Antikörper A18 gerichtet gegen CSFV-E2 als primärer, und mit dem Gold-beladenen Anti-Maus-Antikörper als zweiter Komponente durchgeführt. Die Partikelgruppe links oben im Bild bezeichnet E2-rekombinante Viren, während andere Viruspartikel den Helferviren zu entsprechen scheinen. (Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Herrn Dr. M. König, Institut für Virologie der Universität Giessen zur Verfügung gestellt.)

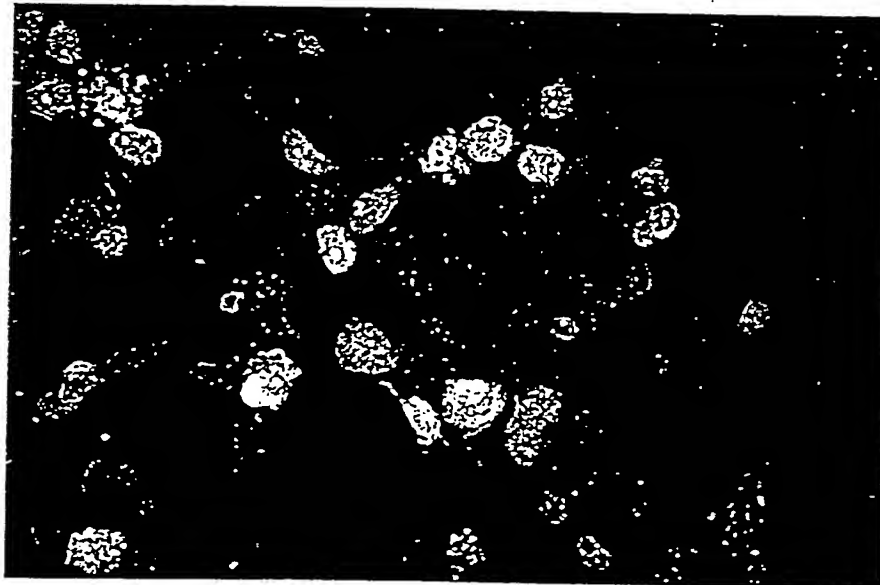


Abbildung 7: Expression von grün-fluoreszierendem Protein in MDCK-Zellen nach Infektion durch GFP-rekombinante Influenzaviren (in zweiter Passage). Das mikroskopische Bild wurde vier Stunden nach der Infektion aufgenommen (mit beginnender GFP-Bildung bzw. Fluoreszenz-Emission), im Emissionslicht von 590 nm, nach Immission bei 480 nm (Filter). Dunkle Zellen sind nicht infiziert oder nicht rekombinant infiziert.

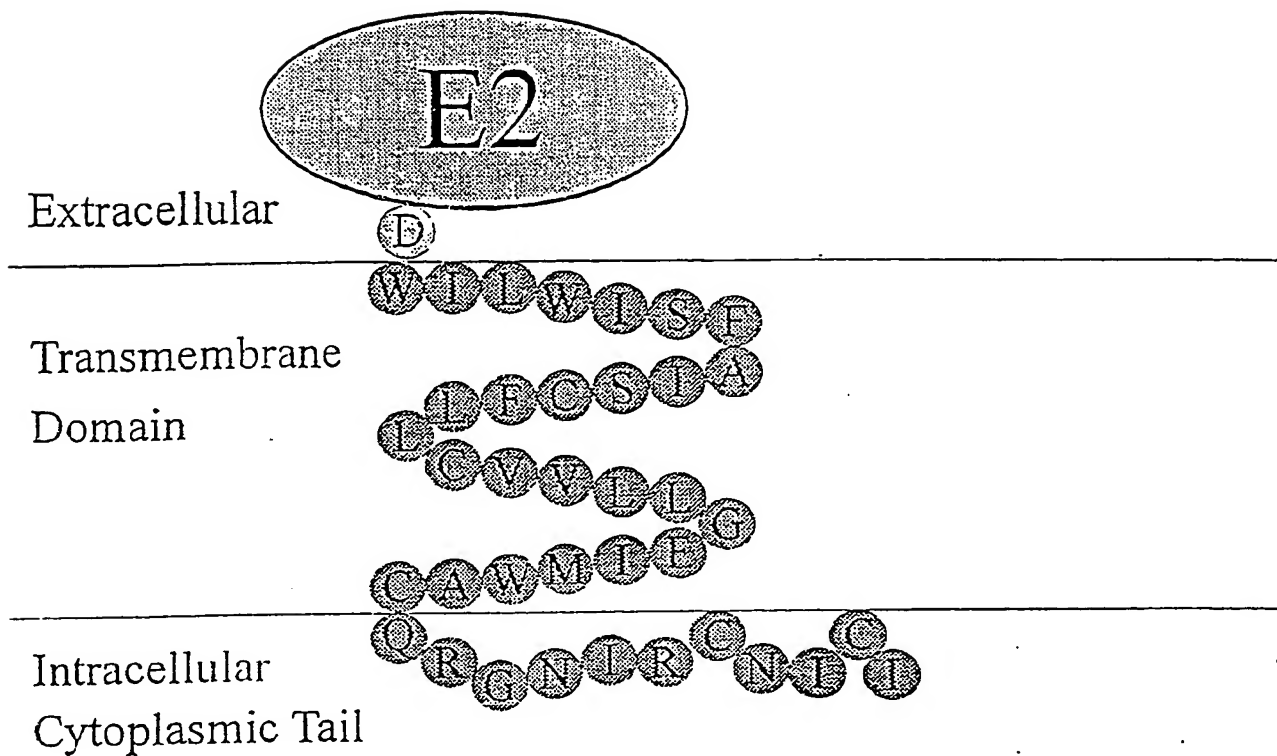


Abbildung 5: Schematische Darstellung des CSFV-E2-HA-Fusionsproteins in seiner Membran-Einlagerung. Hellere Anteile, nämlich die gesamte Ekto-Domäne entstammen dem CSFV-E2 Protein, dunklere Anteile entsprechen der HA-Transmembran-Domäne, in hydrophob-helikaler Anordnung, gefolgt von dem hydrophilen, jedoch der Membran angelagerten C-terminalen Segment. Die zwei darin enthaltenen Cysteinreste sowie der Cysteinrest am Ende der Transmembran-Domäne werden palmitoyliert gefunden.

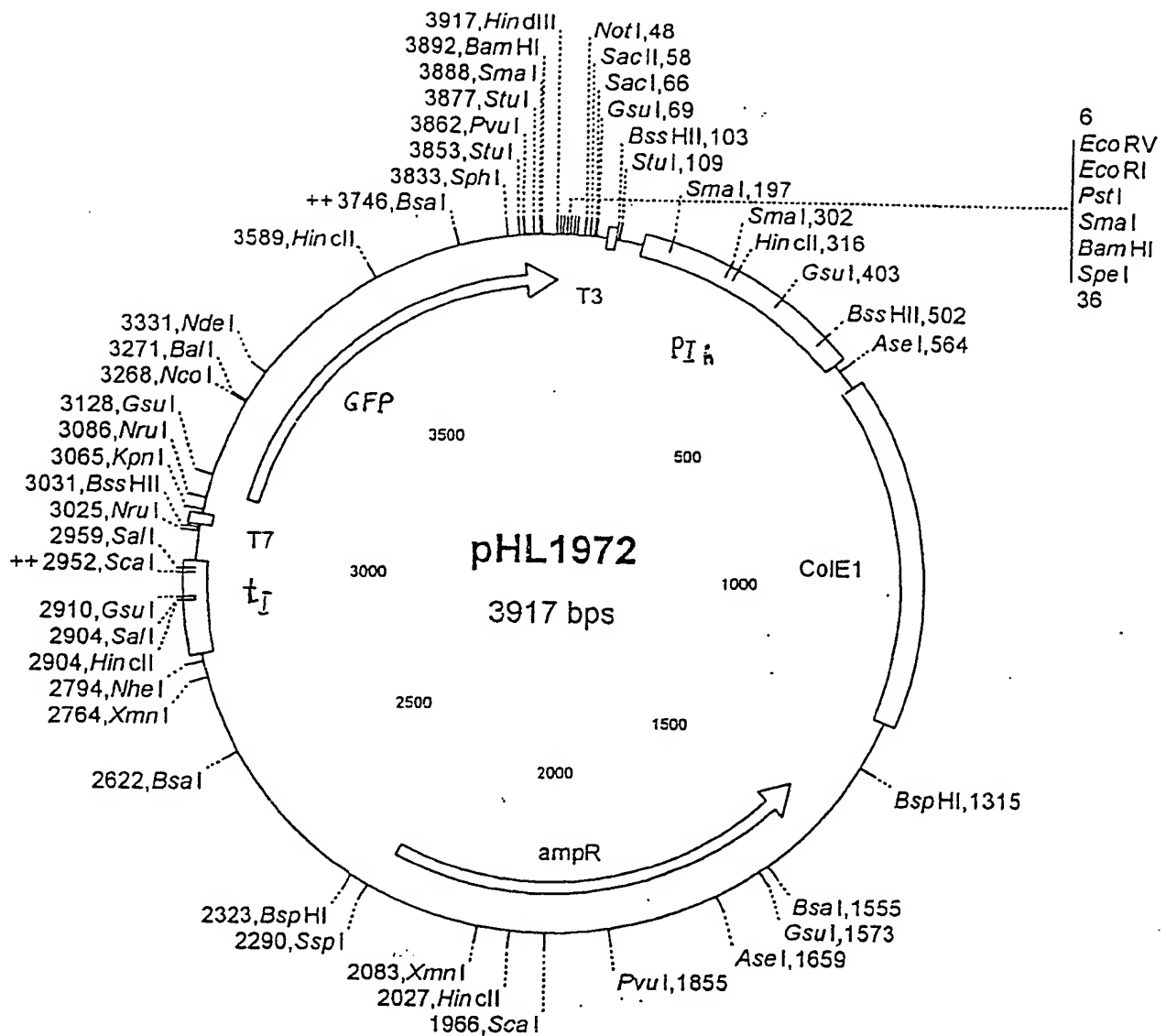


Abbildung 6: Genkarte des GFP-Expressions-Plasmids pHL1972. Die cDNA-Sequenz kodierend für das grün-fluoreszierende Protein (gfp) ist als offener Pfeil entsprechend der Translationsrichtung eingetragen (an den C-Terminus sind sechs zusätzliche Histidin-Codons angefügt). Unmittelbar ist das Gen umgeben von Klonierungssequenzen, entnommen aus dem Vektorplasmid pBluescript SK, einschließlich der Promotorsequenzen für die RNA-Polymerasen T3 und T7. Anschließend folgen die 5'- und 3'-Endsequenzen des Influenza vRNA-Segments 5, und dann der humane RNA-Polymerase I-Promotor ( $p_{HI}$ ) und der murine rDNA-Terminator ( $t_I$ ), auf deren Transkriptionsrichtung bezogen das GFP-Gen in Minusstrangrichtung angeordnet ist, entsprechend der Synthese einer vRNA durch die RNA-Polymerase I. ColE1 = Plasmid-Replikationssystem, ampR = Gen für Ampicillin-Resistenz. Wichtige Restriktionsschnitte sind mit ihrer genauen Position eingetragen.

## FACS-Analyse

MDCK-Zellen: 8 h nach Infektion mit rekombinanten Influenza-Viren

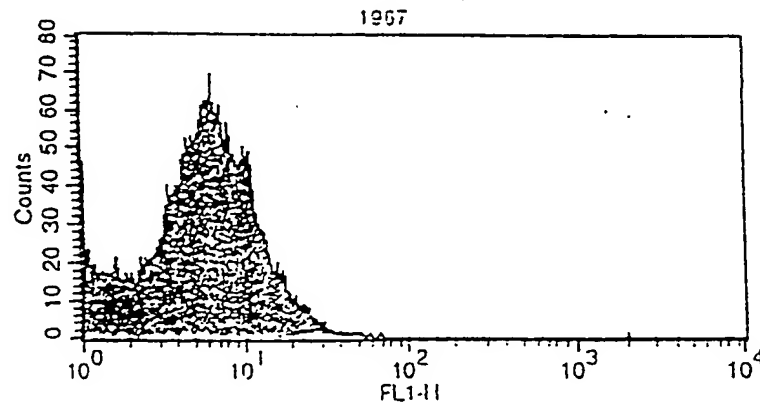
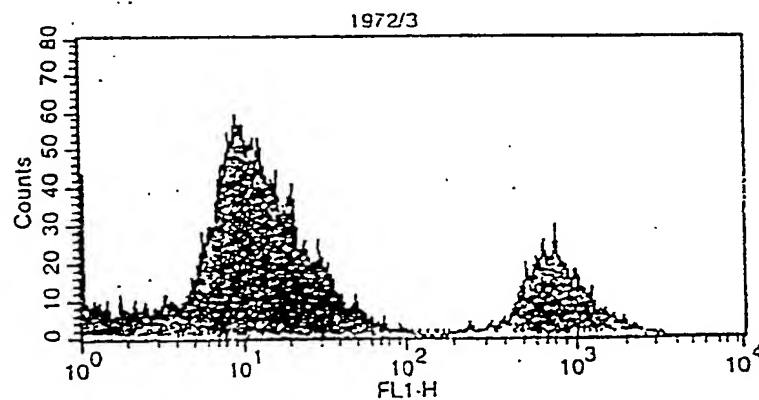
1. pHL1967 (gfp<sup>-</sup>)2. pHL1972 (gfp<sup>+</sup>)

Abbildung 8: FACS-Analyse der MDCK-Zellen nach der Infektion durch pHL1972-GFP-rekombinante Influenzaviren (im Gemisch mit Helferviren). MDCK-Zellen wie in Abb. 7 in zweiter Passage infiziert durch pHL1972-rekombinante Influenzaviren wurden nach 8 Stunden trypsinisiert und im FACS-Gerät (Beckton-Dickinson) nach ihrer Fluoreszenz-Emission separiert. Zum Vergleich ist auch die FACS-Analyse von MDCK-Zellen gezeigt, die durch ein nicht-GFP-rekombinantes Influenzavirus (pHL1967) in gleicher Passage infiziert waren. Fluoreszenz-Aktivierung bei 488 nm, Emissionsanalyse bei 530 nm.